

Isolierung und Charakterisierung von Makrophagen aus dem Knochenmark des Meerschweinchens

Vorgelegt

von

Libor Jelinek

aus

Teplice - CSSR



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0040

Aus dem Institut für klinische Mikrobiologie und Infektionshygiene der Universität Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Prof. Dr. W. Knapp

Isolierung und Charakterisierung von Makrophagen
aus dem Knochenmark des Meerschweinchens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Libor Jelinek
aus Teplice CSSR

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. V. Brade

Korreferent: Prof. Dr. W. Knapp

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.1983

1. Einleitung

- 1.1 Herkunft und Verteilung der mononukleären Phagozyten
- 1.2 Funktion der mononukleären Phagozyten
- 1.3 Möglichkeiten der Gewinnung verschiedener Populationen von mononukleären Phagozyten
- 1.4 Charakterisierung von mononukleären Phagozyten in vitro
- 1.5 Herstellung von Makrophagenkulturen in Säugetieren
- 1.6 Fragestellung

2. Material und Methoden

2.1 Makrophagen-Zellkultur

2.1.1 Tiere

2.1.2 Kulturmedium mit Zusätzen

2.1.3 Kulturschalen und Deckgläschen

2.1.4 Reinigung der Deckgläschen

2.1.5 Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen und Anlegen einer Kultur

2.1.6 Waschtechnik der Zellen und ihre weitere Verwendung

2.2 Färbeverfahren

2.2.1 Giemsa-Färbung

2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

2.3 Cytochemie

2.3.1 Esterasereaktion

2.3.2 Peroxidasereaktion

2.4 Phagozytose

2.4.1 Phagozytose von Bakterien

2.4.2 Phagozytose von Erythrozyten

2.5 Photometrische Tests

2.5.1 Messung der Lactatdehydrogenase

2.5.2 C3 - Test

2.5.3 Messung der N-acetyl- β -D-Glucosaminidase

3. Ergebnisse

3.1 Kultur von mononukleären Phagozyten

3.2 Charakterisierung von mononukleären Phagozyten

3.2.1 Morphologie

3.2.2 Esteraseaktivität

3.2.3 Peroxidaseaktivität

3.2.4 Phagozytose von Bakterien und Erythrozyten

3.3 Sekretorische Leistungen von mononukleären Phagozyten

3.3.1 β -D-Glucosaminidase

3.3.2 Komplementkomponente C3

4. Diskussion

4.1 Bewertung des methodischen Vorgehens bei der Reinigung von Knochenmarksmakrophagen

4.1.1 Einfluß des Kälberserums (NBCS)

4.1.2 Einfluß der Glasoberfläche

4.1.3 Einfluß der Kulturdauer

4.2 Vergleich der isolierten Knochenmarksmakrophagen des Meerschweinchens mit Makrophagenkulturen anderer Herkunft

4.2.1 Charakterisierung der Makrophagen

4.2.2 Sekretionsleistungen der Knochenmarksmakrophagen

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Herkunft und Verteilung der mononukleären Phagozyten

Makrophagen gehören zum System der mononukleären Phagozyten. Alle Zellen dieses Systems haben ihren Ursprung in Stammzellen des Knochenmarks und reifen dort über mehrere Vorläuferstufen (Monoblasten, Promonozyten) zu Monozyten heran (34, 42, 43, 44, Tabelle 1). Die Monozyten gelangen in die Blutbahn, welche sie nach kurzer Zirkulationszeit wieder verlassen, um sich in verschiedenen Organen und Geweben anzusiedeln. Dort erfolgt die endgültige Differenzierung zu den ortsständigen Makrophagen (23, 25, 32). Viele Organe besitzen dadurch eine eigene Population von mononukleären Phagozyten, die mit besonderen Namen gekennzeichnet sind (Tabelle 1). Die Vielfalt der Namen geht auf die Zeit zurück, in der man die Zellen in histologischen Präparaten beobachtete, ohne ihren gemeinsamen Ursprung zu kennen.

Untersuchungen über die Verteilung der Monozyten im Säugetierkörper haben ergeben, daß ca. 56% der Blutmonozyten zu v.Kupfferschen Sternzellen ausdifferenzieren, 10% zu Alveolarmakrophagen und 8% zu Peritonealmakrophagen. Die restlichen 26% verteilen sich auf das übrige Gewebe (40). Die Anzahl der Makrophagen im gesunden Gewebe ist zu klein für eine wirksame antimikrobielle Abwehr. Daher gibt es spezielle Rückkoppelungsmechanismen zwischen dem Knochenmark und den durch die Entzündung stimulierten residenten Makrophagen (45, 62). Diese können einen Faktor sezernieren (Factor Increasing Monocytopoiesis, FIM), welcher im Bedarfsfall die Reifung und Ausschleusung von Monozyten aus dem Knochenmark vervielfacht (40, 41, 79). Die Sekretion des Colony Stimulating Factor (CSF) unterstützt die lokale Vermehrung von eingewanderten Monozyten (34, 49, 61, 73). Mit Hilfe chemotaktischer Faktoren wird eine selektive Anreicherung der Zellen im Entzündungsgebiet erreicht (26, 31, 71). Diese Regulationsmechanismen sind notwendig, da die mononukleären Phagozyten ab der Stufe der Makrophagen nicht mehr teilungsfähig sind.

1.2 Die Funktion der mononukleären Phagozyten

Die Rolle der mononukleären Phagozyten im Entzündungsgebiet ist sehr komplex und eng mit der Funktion anderer immunologischer Mechanismen verflochten. Die Hauptaufgabe dieser Zellen besteht einerseits in der Phagozytose von Fremdkörpern, andererseits in der Sekretion vieler humoraler Substanzen mit Mediator- oder Regulatorfunktion (31, 55, 74, 76, Tabelle 2).

Bei der Phagozytose werden aufgenommene Partikel nicht nur abgetötet und verdaut, sondern ihre Antigenstruktur wird aufgeschlüsselt. Diese Antigeninformation wird mit Hilfe von T-Helfer-Zellen an die spezifische Abwehr weitervermittelt und ermöglicht die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen dieses Antigen (4, 9).

In den Makrophagen findet außerdem die Synthese von vielen lysosomalen Enzymen statt, welche teilweise auch nach außen sezerniert werden und ihre Wirkung als direkte Entzündungsmediatoren entfalten (72, 77). Das sind insbesondere Enzyme wie die Kollagenase oder Elastase, die bestimmte Bindegewebsanteile abbauen können (80, 81, 83). Mit Hilfe lysosomaler saurer Hydrolasen wird die Auflösung von Bakterien in den Phagolysosomen beschleunigt (19, 48, 72).

Sezernierte Hydrolasen tragen ebenso wie das Lysozym zur extrazellulären Abtötung von Bakterien bei.

Die von den Makrophagen aus Membranlipiden produzierten Prostaglandine beeinflussen den Entzündungsprozeß sowohl als inflammatorische als auch als antiinflammatorische Substanzen. Einerseits steigern sie die Gefäßpermeabilität im Entzündungsgebiet und sind chemotaktisch wirksam, andererseits hemmen sie die Freisetzung von lysosomalen Enzymen (12, 29, 68).

Durch die Synthese und Sekretion von Komplementfaktoren C1, C2, C3, C4, Faktor B, Faktor D und Properdin (6, 13, 14, 57, 63, 82, 84) begünstigen die Makrophagen die zytotoxische Reaktion (37, 38, 54, 66) und die Tumorabwehr (69, 75).

Einzelne Komplementbruchstücke haben ihrerseits vielfältige Wirkungen als permeabilitätssteigernde (C3a, C5a), chemotaktische (C5a), enzyminduzierende (C3b) und opsonierende (C3b) Substanzen (12, 33, 72, 78).

Sezernierte Interferone hemmen die Virusvermehrung und Proliferation tierischer Zellen (12, 36, 64).

Durch die Bildung von regulatorisch wirksamen Substanzen beeinflussen die Makrophagen die Reifung und Ausschleusung von Monozyten im Knochenmark (Factor Increasing Monocytopoiesis, FIM) (40, 41, 79), die lokale Proliferation von Monozyten im Gewebe (Colony Stimulating Factor, CSF) (21, 61, 70), die Funktion von B- und T-Lymphozyten (Stimulatoren und Inhibitoren der B- und T-Zellfunktion) (9, 35, 39, 55, 58), und die Bildung von Granulationsgewebe durch Förderung des Fibroblasten- und Angioblastenwachstums (74).

Die Phagozytose- und Sekretionsleistung der mononukleären Phagozyten ist stark von ihrem Aktivierungsgrad abhängig (9, 26, 53).

Bei einer Reihe von Entzündungsprozessen, die meist einen chronischen Verlauf haben, findet man auch pathologisch veränderte Makrophagen, z.B. die Epitheloidzellen und mehrkernige Riesenzellen. Da bei diesen Erkrankungen eine vollständige Elimination der Ursache nicht möglich ist (Autoimmunkrankheit, nicht phagozytierbare Bakterien, unverdauliche Fremdkörper), entstehen chronische Entzündungsvorgänge im Gewebe z.T. mit Granulombildung. Hierbei spielen Gewebsmakrophagen vor allem als Sekretionszellen eine Rolle (1, 27, 28). Diese permanenten Entzündungs- und Umbauvorgänge können in schweren Fällen ganze Organstrukturen zerstören.

1.3 Möglichkeiten der Gewinnung verschiedener Populationen von mononukleären Phagozyten

Um die komplexen Funktionen der mononukleären Phagozyten *in vitro* zu erforschen, ist es notwendig, Zellpopulationen möglichst in Reinkultur zu untersuchen. Doch die physiologische Verteilung der Phagozyten im Organismus bereitet bei ihrer Gewinnung große Schwierigkeiten. Es gibt nur wenige Möglichkeiten, mononukleäre Phagozyten in Kultur zu bringen. Folgende Makrophagen werden am häufigsten für experimentelle Untersuchungen eingesetzt:

- 1/ Alveolarmakrophagen: Bei der Gewinnung von Alveolarmakrophagen werden Bronchien von Versuchstieren mit Spülmedium durchgespült, um die

- auf dem Respirationsepithel befindlichen Phagozyten abzulösen (10).
- 2/ Peritonealmakrophagen: Durch Spülung der Peritonealhöhle mit Spülmedium können ebenfalls Zellen für Makrophagenkulturen gewonnen werden. Um die Zellausbeute zu verbessern, kann man einige Zeit vor dem Spülvorgang durch intraperitoneale Applikation von Fremdstanzen (z.B. Stärkegellösung, Mineralöl) eine Entzündung des Peritoneums induzieren (6).
 - 3/ Blutmonozyten: Durch geeignete Trennmethode können Monozyten direkt aus dem peripheren Blut gewonnen werden (3, 30).
 - 4/ Knochenmarksmakrophagen: Aus einer Suspension von Knochenmarkszellen können Makrophagenkulturen gewonnen werden. Einerseits verfügt das Knochenmark über eine eigene Population von reifen Gewebsmakrophagen, andererseits können die dort befindlichen Vorläuferzellen während der Inkubation ausreifen. Durch Präparationen von CSF (Colony Stimulating Factor) können die Vorläuferzellen in vitro zur Bildung von Kolonien angeregt werden. Aus Knochenmarkskulturen kann über den Mechanismus der Zellproliferation und Differenzierung eine große Anzahl von Makrophagen gewonnen werden (17).

Alle Zellpopulationen, welche mit den obengenannten Methoden gewonnen werden, sind mit fremden Zellen kontaminiert (Granulozyten, Fibroblasten u.a.). Ein in vitro Trennverfahren muß daher angeschlossen werden. Eine Abtrennung der Makrophagen von anderen Zellen wird dadurch erleichtert, daß mononukleäre Phagozyten fest auf Oberflächen (Glas, Plastik) adhärieren. Kontaminierende, nichtadhärente Zellen werden durch einen Waschprozeß entfernt. Der verbleibende Zellrasen besteht fast ausschließlich aus Makrophagen. Die Fähigkeit zur Adhärenz ist besonders bei den ausdifferenzierten Makrophagen der Organe und Gewebe ausgeprägt. Die Vorläuferzellen dieser Makrophagen, wie sie im Knochenmark vorliegen, neigen noch nicht zu dieser festen Anheftung an Oberflächen.

1.4 Charakterisierung der mononukleären Phagozyten in vitro

Nach Herstellung der Zellkulturen mit den vorher genannten Methoden wird jede Kultur auf bestimmte morphologische, biochemische und funktionelle Eigenschaften hin untersucht. Damit wird die gewonnene Zellpopulation charakterisiert und der Reinheitsgrad der jeweiligen Kultur ermittelt. Die Untersuchungsmethoden, die hierbei eingesetzt werden, wurden vor allem zur Charakterisierung von mononukleären Phagozyten der Maus erarbeitet (47).

Ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung von Makrophagen ist ihre Phagozytosefähigkeit. Hierbei werden entweder Bakterien oder andere Partikel zur Aufnahme angeboten (46, 59). Dieser Test erlaubt eine Unterscheidung zwischen sehr jungen (Monoblasten, Promonozyten) und reiferen Zellen, da die Vorläuferzellen erst allmählich die Fähigkeit zur Phagozytose erlangen (40).

Weiterhin können bestimmte cytoplasmatische Enzyme wie z.B. die Esterase und Peroxidase färberisch dargestellt werden (18, 65). Die Esterasereaktion ist stark vom Reifungszustand der mononukleären Phagozyten abhängig und erst bei den ausdifferenzierten Makrophagen in einem hohen Prozentsatz nachweisbar (40). Beim Nachweis der Peroxidase liegen fast umgekehrte Verhältnisse vor. Während die Promonozyten und Monozyten aus dem Knochenmark peroxidase-positiv sind (>90 %), zeigen reife Gewebsmakrophagen fast keine (<1 %) und subcutane Makrophagen und periphere Monozyten eine mittlere Peroxidaseaktivität (50-60%). Der Abfall der Peroxidase soll eng mit dem Reifungsprozeß der Zellen zusammenhängen (5, 47).

Mit anderen Verfahren kann man das Vorhandensein einzelner Membranrezeptoren prüfen, z.B. des Komplement-C3b-(33, 56) und des Fc-Rezeptors (3). Der Fc-Rezeptor ermöglicht die Phagozytose von Schaferythrozyten, welche mit IgG beladen sind, der C3b-Rezeptor vermittelt die Anlagerung und auch Phagozytose von C3b tragenden Schaferythrozyten (50, 51). Ohne Vorbehandlung mit IgG oder C3b werden Erythrozyten nur in ganz geringem Umfang phagozytiert. Im Verlauf der Zelldifferenzierung nimmt die Fc- und C3b-Rezeptoraktivität bei den mononukleären Phagozyten zu (40).

Eine lichtmikroskopisch-morphologische Beurteilung der Kulturen eignet sich gut für die Identifikation fremder Zellarten (Granulozyten, Fibroblasten), erlaubt jedoch nur eine grobe Einteilung der Phagozytenkulturen und macht keine eindeutigen Aussagen über den jeweiligen Reifungsgrad der Zellen (20, 22).

Die Messung sezernierter Faktoren (Tabelle 2) erlaubt eine funktionelle Charakterisierung der untersuchten Zellpopulation. Für einige Sekretionsparameter (z.B. neutrale Proteasen) ist bekannt, daß sie nur von aktivierten Makrophagen freigesetzt werden (19, 72). Die Messung derartiger Produkte ermöglicht somit eine Aussage über den Aktivierungszustand der Makrophagen.

Um die Teilungsfähigkeit der Zellen in Kultur zu überprüfen, wird die Einbaurate von ^3H -Thymidin in die zelluläre DNS untersucht. Solche Versuche haben gezeigt, daß nur die Vorläuferzellen im Knochenmark in hohem Maße teilungsfähig sind (17, 21, 34).

1.5 Herstellung von Makrophagenkulturen in Säugetieren

Bei der Erforschung und Charakterisierung von Makrophagenkulturen ist man größtenteils von Mausmakrophagen ausgegangen. Die Mauskulturen sind in vitro leicht zu halten und stellen keine besonderen Anforderungen an die Kulturmedien. Sie haben jedoch entscheidende Nachteile: Da die Zellzahl pro Tier klein ist, werden zur Herstellung von Kulturen viele Tiere benötigt, deren Zellen gemischt werden. Außerdem lassen sich bestimmte Sekretionsprodukte, z.B. Komplementfaktoren, mangels geeigneter Testverfahren gar nicht oder nur mit geringer Empfindlichkeit messen. Für vergleichende histologische Untersuchungen, z.B. des lymphatischen Systems, ist die Maus wegen ihrer Größe ebenfalls ungeeignet.

Deswegen rücken größere Labortiere, insbesondere das Meerschweinchen, immer mehr in den Vordergrund. Es ist gelungen, beim Meerschweinchen verschiedene Makrophagenpopulationen zu gewinnen wie z.B. peritoneale (6) oder v.Kupffersche Sternzellen (24), obwohl sie in Kultur empfindlicher als vergleichbare Zellen der Maus sind. Die Nachweismethoden

für einzelne Komplementfaktoren sind bereits entwickelt (6, 13, 16).

Peritoneale Makrophagen von Meerschweinchen können nur nach vorheriger Stimulation in großer Zahl aus der Bauchhöhle gewonnen werden. Eine derartige Stimulation wird durch intraperitoneale Injektion von entzündungsfördernden Substanzen (z.B. Stärkegel) erreicht. Eine Methode zur Gewinnung unstimulierter und daher noch kontrolliert stimulierbarer Makrophagen im Ein-Tier-System erscheint deswegen wünschenswert. Die Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen aus unvorbehandelten Meerschweinchen ist somit ein wichtiges experimentelles Problem.

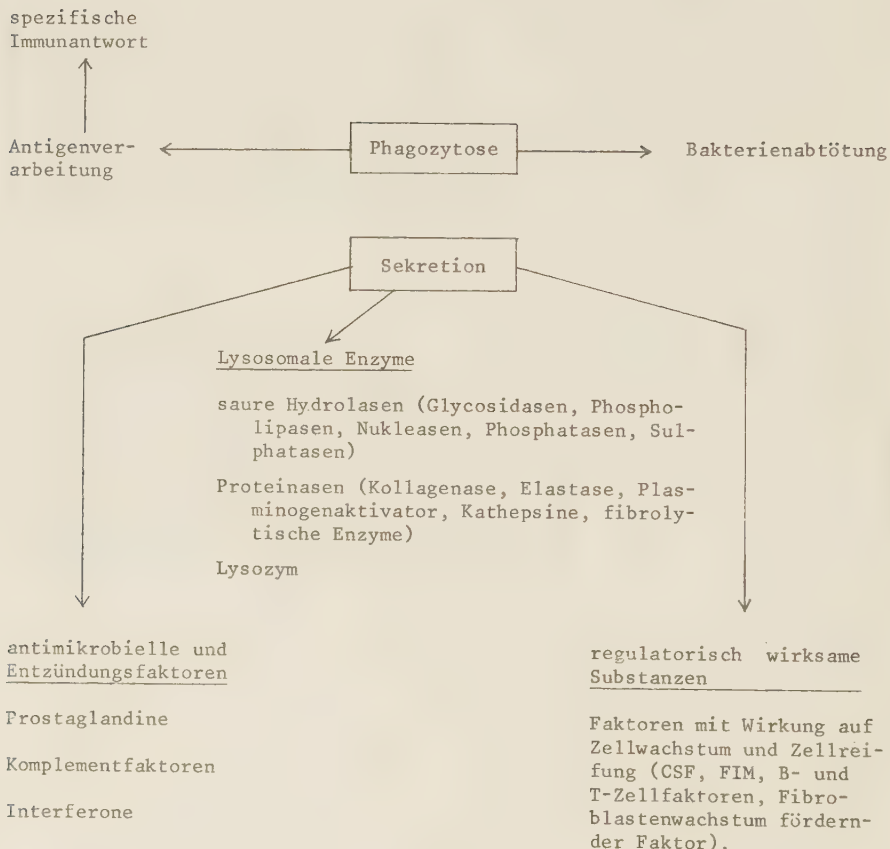
1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode erarbeitet werden, um die Knochenmarksmakrophagen vom unbehandelten Meerschweinchen *in vitro* zu isolieren und zu züchten. Die weitere Aufgabe bestand darin, die isolierten Zellen mit verschiedenen Methoden zu charakterisieren und als Makrophagen zu identifizieren. Ferner sollte geprüft werden, ob Knochenmarksmakrophagen aus unbehandelten Tieren zu sekretorischen Leistungen befähigt sind.

Table 1. *Inventory, self-assessment and screening for common-law physicians*

Screening questions	Yes	No	Comments
1. Do you have a medical degree?			
2. Do you have a medical license?			
3. Do you have a medical degree?			
4. Do you have a medical license?			
5. Do you have a medical degree?			
6. Do you have a medical license?			
7. Do you have a medical degree?			
8. Do you have a medical license?			
9. Do you have a medical degree?			
10. Do you have a medical license?			
11. Do you have a medical degree?			
12. Do you have a medical license?			
13. Do you have a medical degree?			
14. Do you have a medical license?			
15. Do you have a medical degree?			
16. Do you have a medical license?			
17. Do you have a medical degree?			
18. Do you have a medical license?			
19. Do you have a medical degree?			
20. Do you have a medical license?			
21. Do you have a medical degree?			
22. Do you have a medical license?			
23. Do you have a medical degree?			
24. Do you have a medical license?			
25. Do you have a medical degree?			
26. Do you have a medical license?			
27. Do you have a medical degree?			
28. Do you have a medical license?			
29. Do you have a medical degree?			
30. Do you have a medical license?			
31. Do you have a medical degree?			
32. Do you have a medical license?			
33. Do you have a medical degree?			
34. Do you have a medical license?			
35. Do you have a medical degree?			
36. Do you have a medical license?			
37. Do you have a medical degree?			
38. Do you have a medical license?			
39. Do you have a medical degree?			
40. Do you have a medical license?			
41. Do you have a medical degree?			
42. Do you have a medical license?			
43. Do you have a medical degree?			
44. Do you have a medical license?			
45. Do you have a medical degree?			
46. Do you have a medical license?			
47. Do you have a medical degree?			
48. Do you have a medical license?			
49. Do you have a medical degree?			
50. Do you have a medical license?			
51. Do you have a medical degree?			
52. Do you have a medical license?			
53. Do you have a medical degree?			
54. Do you have a medical license?			
55. Do you have a medical degree?			
56. Do you have a medical license?			
57. Do you have a medical degree?			
58. Do you have a medical license?			
59. Do you have a medical degree?			
60. Do you have a medical license?			
61. Do you have a medical degree?			
62. Do you have a medical license?			
63. Do you have a medical degree?			
64. Do you have a medical license?			
65. Do you have a medical degree?			
66. Do you have a medical license?			
67. Do you have a medical degree?			
68. Do you have a medical license?			
69. Do you have a medical degree?			
70. Do you have a medical license?			
71. Do you have a medical degree?			
72. Do you have a medical license?			
73. Do you have a medical degree?			
74. Do you have a medical license?			
75. Do you have a medical degree?			
76. Do you have a medical license?			
77. Do you have a medical degree?			
78. Do you have a medical license?			
79. Do you have a medical degree?			
80. Do you have a medical license?			
81. Do you have a medical degree?			
82. Do you have a medical license?			
83. Do you have a medical degree?			
84. Do you have a medical license?			
85. Do you have a medical degree?			
86. Do you have a medical license?			
87. Do you have a medical degree?			
88. Do you have a medical license?			
89. Do you have a medical degree?			
90. Do you have a medical license?			
91. Do you have a medical degree?			
92. Do you have a medical license?			
93. Do you have a medical degree?			
94. Do you have a medical license?			
95. Do you have a medical degree?			
96. Do you have a medical license?			
97. Do you have a medical degree?			
98. Do you have a medical license?			
99. Do you have a medical degree?			
100. Do you have a medical license?			

Tabelle 2: Phagozytose und Sekretionsprodukte von mononukleären Phagozyten



2. Material und Methoden

2.1 Makrophagen-Zellkultur

2.1.1 Tiere

Für unsere Versuche verwendeten wir nur weiße, weibliche und nicht-trächtige Meerschweinchen mit einem Gewicht von 450-650 g. Am Versuchstag wurden sie durch Genickschlag getötet und ausgeblutet.

2.1.2 Kulturmedium mit Zusätzen

Als Kulturmedium wurde in allen Versuchen das "Modified Earl's Salt Medium", (M199), Flow Lab. Meckenheim, mit einem Zusatz von Penicillin (100 I.E./ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Glutamin (0,68mMol) verwendet. Als Serumzusatz diente das "Newborn Calf Serum" (NBCS) Flow Lab. Meckenheim in Konzentrationen von 30Vol% für die Herstellung der Makrophagenkultur bis zum 7. Tag oder in 5 bzw. 20Vol% für die zweite Inkubationsphase nach dem Waschen am 7. Tag.

2.1.3 Kulturschalen und Deckgläschen

Die Suspension von Knochenmarkszellen wurde in Makro-Plastikkulturschalen (Greiner Lab. Nürtingen) mit sechs Vertiefungen (Durchmesser 35 mm) inkubiert. Als Adhärenzfläche verwendeten wir runde Deckgläschen (Menzel) mit 28 mm Durchmesser, die wir nach einer Reinigungsprozedur in die Vertiefungen hineinlegten.

2.1.4 Reinigung der Deckgläschen

Arbeitsschritte: 1/ Inkubation in einer 1%igen Detergenslösung (Seven X) für eine Stunde bei 80°C, 2/ 10 x waschen mit zunächst vorgewärmten (80°C) Aqua dem., dann mit kaltem Aqua dem., 3/ Inkubation in einer 0,05 molaren, kalten HCl-Lösung für ca. 1 Stunde, 4/ 10 x waschen mit kaltem Aqua dem., 5/ Trocknung mit Heißluft. Diese Reinigungsprozedur fand statt in einem eigens dafür hergestellten Behälter aus rostfreiem Stahl mit einem Fassungsvermögen

von ca. 400 ml, in dem die Deckgläschen in Schienen mit eingesägten Schlitzten aufgestellt waren. Wenn die Deckgläser nicht gleich im Anschluß an die Reinigung verwendet wurden, wurden sie vor Gebrauch heißluftsterilisiert.

2.1.5 Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen und Anlegen einer Kultur

Das ausgeblutete Meerschweinchen wurde mit dem Rücken auf eine Korkplatte gelegt und mit zwei Nadeln an den Vorderpfoten fixiert. Mit einer Schere wurde die Haut und Muskulatur in der Höhe des Hüftgelenks durchgeschnitten und das Hüftgelenk freigelegt. Anschließend wurde der Femurkopf aus der Hüftpfanne herausgehoben und das ganze Bein wurde abgetrennt. Nach der Isolierung und Säuberung des Femurs wurden die Femurenden mit einer kleinen Handsäge abgesägt. Das Knochenmark wurde aus dem Femurschaft mit 8 ml M199 mit Penicillin-, Streptomycin- und Glutaminzusatz in ein steriles 10 ml Einmalröhrchen gespült. Die Knochenmarkszellen wurden dann mit einer sterilen 10 ml Einmalpipette in Suspension gebracht. Die Zählung der Zellen erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Die durchschnittliche Zellkonzentration im Spülmedium betrug ca. $2,8 \times 10^7$ Zellen/ml. Aus jedem Femur wurden somit etwa $2,24 \times 10^8$ kernhaltige Zellen gewonnen. Die Zellzahl wurde anschließend auf $1,0 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Gleichzeitig wurde das Medium mit NBGS in einer Endkonzentration von 30Vol% versetzt. Je 2 ml dieser Suspension (2×10^7 Zellen) wurden in die Vertiefungen der Kulturschalen hineinpipettiert und inkubiert (Flow Lab.-Inkubator, 37°C , 5Vol% CO_2).

2.1.6 Waschen der Knochenmarkskulturen und ihre weitere Verwendung

Am Testtag wurden die Kulturen unter sterilen Bedingungen mit erwärmtem (37°C) M199 mit Penicillin, Streptomycin und Glutamin viermal kräftig gewaschen, um alle nicht adhärenen Zellen und Zellreste zu entfernen. Nach diesem Waschvorgang wurden die Kulturen entweder beendet oder weiter in Kultur gehalten. Bei Beendigung der Kulturen wurden die Deckgläschen mit den adhärenen Zellen mit Hilfe eines Skalpell aus den Vertiefungen herausgehoben, luftgetrocknet und jeweils mit der Unterseite mit Hilfe von Eukitt auf Objektträger geklebt. Nach der Färbung (z.B. Giemsa) wurden die Zellen histologisch

eingeschlossen. Die mikroskopisch erfaßbaren Parameter der mononukleären Phagozyten wie Zelldichte, Verunreinigung mit anderen Zellen, Phagozytosefähigkeit und Cytochemie wurden in einem quadratischen Zählfeld mit der Seitenlänge von 0,172 mm bei 320facher Vergrößerung ermittelt. Aus fünf zufälligen Zählungen wurde der Durchschnittswert für die statistische Auswertung gebildet. Die durchschnittliche Dichte der Makrophagen wurde auf mm^2 umgerechnet, die anderen Identifikationsmerkmale wurden in Prozent der Gesamtmakrophagenzahl ausgedrückt.

Für die Messung von Sekretionsprodukten wurden 7 Tage alte Kulturen gewaschen und in einem frischen Medium mit 5 bzw. 20Vol% NBCS weiter inkubiert. Sowohl Kulturüberstände als auch Zellysate wurden auf die Anwesenheit von Sekretions- und Synthese-Produkten untersucht. Die Zellysate wurden durch die Auflösung der adhärenenten Zellen in Lysepuffer (100mM Phosphatpuffer pH 7,0, 0,1% Triton X 100, 0,1% BSA) gewonnen.

2.2 Färbeverfahren

Die von uns angewandten Giemsa- und Hämatoxilin-Eosinfärbungen entsprachen den Standardverfahren bei der Bearbeitung histologischer Präparate. Auf eine genauere Beschreibung des Färbevorganges wurde daher verzichtet. Die Makrophagenmonolayer wurden vor dem Färben nicht fixiert.

2.3 Cytochemische Nachweismethoden

Das Enzym Esterase ist im Zytoplasma der Makrophagen diffus verteilt und kann färberisch dargestellt werden, wenn α -naphtylbutyrat als Substrat verwendet wird (2, 67). Bei dieser Differentialfärbung erscheint das Cytoplasma der Makrophagen diffus braun mit ausgespartem Kern. Die Peroxidase hingegen kann mit Hilfe von Benzidin-Dihydrochlorid nachgewiesen werden. Sie tritt in Form von verschieden großer dunkelblauer Granula im Zytoplasma auf (52). Die Gebrauchslösungen für den Nachweis der Esterase (2,67) und Peroxidase (52) wurden entsprechend den Angaben in der Literatur hergestellt.

Für den Enzymnachweis wurden luftgetrocknete und auf Objektträger geklebte Deckgläschen mit adhärenen Makrophagen in die Gebrauchslösungen getaucht. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. abgespült, luftgetrocknet und mit Eukitt und einem weiteren Deckgläschen histologisch eingedeckt. Als Färbezeiten wählten wir für den Nachweis der Esterase etwa 10 Minuten und für den Nachweis der Peroxidase 30 Sekunden. Abweichend von den Literaturangaben für diese Enzymnachweise wurden die Präparate weder fixiert noch mit Giemsa gegengefärbt.

2.4 Phagozytoseversuche

2.4.1 Phagozytose von Bakterien

Eine dichte Suspension von *Staphylococcus aureus* wurde in M199 mit 10% NBCS hergestellt. Von dieser Suspension wurden 1 ml in jede Vertiefung pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ wurden die Kulturen 2x gewaschen und mit 1 ml einer Lysostaphinlösung (1E/ml, Sigma München) für 15 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurden die Kulturen nochmals 2x gewaschen, die Deckgläschen mit den Makrophagen aus den Vertiefungen herausgehoben, luftgetrocknet und gefärbt (Giemsa).

2.4.2 Phagozytose von antikörperbeladenen Erythrozyten (EA-Zellen)

Zur Beladung von Schafererythrozyten (E-Zellen mit Antikörpern) wurde 1 Volumen E-Zellen (1x 10⁹/ml) mit einem Volumen einer optimalen Amboceptorverdünnung (Behring) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die EA-Zellen auf die Zellzahl von 0,9 x 10⁸/ml in M199 mit 10% NBCS eingestellt. Jede Makrophagenkultur wurde mit 1 ml dieser Zellsuspension für 30 min bei 37°C 5% CO₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit M199 wurden die Kulturen für 30 Sekunden der Einwirkung von Aqua dest. ausgesetzt, um die extrazellulär gelegenen Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurden die Kulturen wieder 2x mit M199 gewaschen, die Deckgläschen herausgenommen und luftgetrocknet.

2.5 Photometrische Tests

2.5.1 Messung der Lactatdehydrogenase

In den Makrophagenkulturen wurde die Menge des zytoplasmatischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) zu verschiedenen Zeiten intrazellulär bestimmt. Die Messung der LDH erfolgte in einem optischen Test mit Pyruvat als Substrat und NADH als Coenzym. In Gegenwart von LDH findet eine Umwandlung des Pyruvats in Lactat statt, die desto schneller abläuft, je mehr LDH in der Probe enthalten ist. Um die Menge an LDH in der Probe quantitativ zu ermitteln, wurde die bei Substratüberschuß auftretende lineare zeitliche Abnahme der Konzentration an NADH gemessen. Die Messung erfolgte bei 366 nm, da bei dieser Wellenlänge das NADH im Gegensatz zu NAD ein starkes Absorptionsmaximum hat. Aus der Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit wurde die Konzentration von LDH berechnet. Bei der Herstellung der Reagentien, der Durchführung des Tests und der quantitativen Auswertung wurde Literaturangaben gefolgt (7).

Für die Messung der LDH wurden die gewaschenen Makrophagen mit 1 ml Lysepuffer (100mM Phosphatpuffer pH 7,0, 0,1% Triton X 100, 0,1% BSA) lysiert. Die zerstörten Zellen wurden zusätzlich mit einem Gummistopfen vollständig von der Oberfläche abgelöst. Zur Entfernung von Zellresten wurden alle Lysate zentrifugiert. Die LDH-Aktivität in den zentrifugierten Zelllysaten wird in U/ml angegeben.

2.5.2 Der C3 Test

In den Kulturüberständen wurde die Komplementkomponente C3 mit einem funktionellen Test gemessen (14). In diesem C3 Test verwendet man einerseits mit den Komplementfaktoren C1, C4 und C2 beladene "sensibilisierte" Schafererythrozyten (EAC142), andererseits ein mit Hydrazinchlorid behandeltes Meerschweinchen Serum, welches die späten Komplementfaktoren C5-C9 enthält. Bei Anwesenheit von C3 in der Probe wird das Komplement vervollständigt und entwickelt über den klassischen Aktivierungsweg seine lytische Aktivität auf die EAC142-Zellen. Bei Überschuß aller anderen Komplementfaktoren

mit Ausnahme von C3 ist die Lyserate quantitativ zur Menge an C3. Die Menge des bei dieser Lyse freiwerdenden Hämoglobins kann im entsprechenden Test photometrisch gemessen werden.

Die Herstellung der EAC $\overline{142}$ -Zellen, des C5-C9-Reagenz und die Durchführung der Tests zur Bestimmung der Menge an C3 in der Untersuchungsprobe erfolgten nach standardisierten Methoden (8).

Aus der photometrisch bestimmten Lyse der EAC $\overline{142}$ -Zellen wurde die Menge des funktionell aktiven C3 errechnet (8). Die gefundenen Werte wurden als Z-Werte angegeben, wobei diese Werte gleichbedeutend sind mit der Anzahl der hämolytisch aktiven C3 Moleküle pro Erythrozyt im Testansatz.

2.5.3 Messung der N-acetyl- β -D-Glucosaminidase

Die N-acetyl- β -D-Glucosaminidase ist eine lysosomale Hydrolase, welche von Makrophagen synthetisiert und auch sezerniert wird. Ihre Konzentration kann im Kulturmedium und im Zellysate mit Hilfe von Paraaminophenyl-N- β -D-Glucopyranosid bestimmt werden. Von dieser Glycosylverbindung wird durch die N-acetyl- β -D-Glucosaminidase der Paraaminophenyl-Rest abgespalten und photometrisch bei 400 nm quantitativ gemessen. Aus der Menge des freigewordenen Paraaminophenol wird die Konzentration an β -D-Glucosaminidase berechnet. Entsprechende Vorschriften wurden der Literatur entnommen (11).

3. Ergebnisse

3.1 Kultur von mononukleären Phagozyten

Die während der Inkubation am Deckglas adhärennten Zellen waren eine Mischung aus mononukleären Phagozyten, Granulozyten und kleinen mononukleären Zellen mit schmalem Zytoplasmasaum. Fibroblasten kamen nur ganz selten vor. Wenn Fibroblastenkolonien auftraten, verwendeten wir die Kulturen nicht. Zur Identifizierung von mononukleären Phagozyten im Zellrasen wurden morphologische Kriterien und verschiedene Testmethoden herangezogen. Bei der morphologischen Beurteilung wurden Zellgröße, Zellform, Kerngröße und Kernform berücksichtigt. Die übrigen Testmethoden umfaßten den intrazellulären Enzymnachweis (Esterase- und Peroxidasereaktion) und den Nachweis der Phagozytosefähigkeit (*Staphylococcus aureus*). Für die Zuordnung einer Zelle zu den mononukleären Phagozyten mußten diese Kriterien ganz oder zum Teil erfüllt sein (vgl. Abschnitt 2). Alle Zellen, die mit diesen Untersuchungsmethoden nicht den mononukleären Phagozyten zuzuordnen waren, wurden unter der Gruppe der "Nicht-Makrophagen" zusammengefaßt. Die überwiegende Zahl der "Nicht-Makrophagen" stellten eindeutig identifizierbare Granulozyten dar.

Während des Inkubationsverlaufes wurden zu verschiedenen Zeiten die Zellzahl aller adhärennten Zellen und gleichzeitig der prozentuale Anteil der mononukleären Phagozyten und der "Nicht-Makrophagen" ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Gesamtzahl vom 3. Tag bis zum 7. Tag um etwa zwei Drittel abfällt. Während dieser Inkubation wird die Zahl der "Nicht-Makrophagen" bis zum 7. Tag drastisch reduziert und macht zu diesem Zeitpunkt etwa 1,5% der Gesamtzellzahl aus. Die übrigen 98,5% waren eindeutig als Makrophagen identifizierbar. Unter den beschriebenen Kulturbedingungen betrug der Prozentsatz der adhärennten mononukleären Phagozyten in jeder Kulturschale am 7. Tag etwa 5% der eingesetzten Menge an Knochenmarkszellen (1×10^6). Unter der Einschränkung, daß keine erhebliche Vermehrung der Makrophagen durch Zellteilung während der 7-tägigen Kulturperiode stattfindet und daß die meisten Makrophagen adhärrieren und lebensfähig bleiben, ergibt sich bei der

angewandten Methode eine Ausbeute von etwa $2,2 \times 10^7$ mononukleären Knochenmarkspagozyten pro Tier.

3.2 Charakterisierung von mononukleären Phagozyten

3.2.1 Morphologie

Die Knochenmarkskulturen wurden vom 3. bis zum 7. Tag lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 2). Dabei stellte sich heraus, daß die Morphologie der Makrophagen ein uneinheitliches Bild bot. Die Zellgröße schwankte zwischen 15 und 60 μm im größten Durchmesser. Die Zellformen reichten von kleinen abgerundeten bis hin zu mehrkernigen Riesenzellen. Zwischen dem 3. und 6. Tag konnte man Zellhaufen mit ca. 10 bis 60 Zellen beobachten, die erst am 7. Tag weitgehend aufgelöst waren. In diesen Zellhaufen fand man eher kleinere runde Zellen in engem Verband. Einzeln stehende Makrophagen waren mehr länglich mit zwei oder mehreren Zytoplasmaausläufern, die teilweise andere Zellen überlappten. Das Zytoplasma war schaumig, mit kleinen Vakuolen und basophil. Die Zellkerne der Kulturen waren in den meisten Fällen rund bis länglich, seltener eingebuchtet, mit mehreren kleinen Nukleolen. Ihre Größe betrug etwa 8 bis 15 μm . Der Prozentsatz an zwei- oder mehrkernigen Zellen betrug ca. 3-5%. Diese Zellen standen sehr oft einzeln (Abb. 3).

Nach dem Waschen am 7. Tag und weiterer Inkubation im frischen Kulturmedium wurde erneut Ausbildung von Zellverbänden beobachtet, welche sich innerhalb von 48 Stunden auflösten (Abb. 4).

3.2.2 Esteraseaktivität

Bei der kurzen Einwirkungszeit von 7 bis 11 Minuten war das Zytoplasma der Makrophagen schon diffus dunkelbraun, die kleineren, in Zellhaufen stehenden Zellen waren stark positiv. Einzelstehende, größere Zellen erschienen wegen der geringeren Zytoplasmattiefe etwas heller. Ihr Zellkern war meistens ausgespart. Der Prozentsatz der Esterase-negativen Zellen zwischen dem 3. und 7. Tag betrug weniger als 1% der mononukleären Phagozyten (Abb. 5).

3.2.3 Peroxidaseaktivität

Diese Enzymaktivität war in einzeln stehenden Makrophagen überwiegend negativ, wogegen in den Zellhaufen sehr viele positive Zellen anzutreffen waren. Die Anzahl der Peroxidasepositiven nahm im Verlauf der Zellkultur kontinuierlich ab. Während am 3. Tag etwa die Hälfte aller Makrophagen peroxidasepositiv war, sank der Anteil an positiven Zellen zum 7. Tag auf ca. 12% (Abb. 6). Nach dem Waschen der Kulturen am 7. Tag und Fortsetzung der Inkubation in frischem Kulturmedium (siehe Abschnitt 3.3) kam es innerhalb von 9 Stunden zu einem vollständigen Verschwinden dieser Enzymaktivität.

3.2.4 Phagozytose von Bakterien und Erythrozyten

Sowohl *Staphylococcus aureus* als auch Antikörper-beladene Schafer erythrozyten (EA-Zellen) wurden sehr intensiv aufgenommen (Abb. 7 und 8). Häufig waren so viele Zellen phagozytiert, daß morphologische Einzelheiten nicht mehr erkennbar waren. Schafer erythrozyten ohne Antikörper (E-Zellen) wurden nur von etwa 25% der Makrophagen phagozytiert. Bei dieser Phagozytose war die Anzahl der aufgenommenen E-Zellen deutlich kleiner als bei den EA-Zellen (Abb. 9). Zur besseren Differenzierung der Phagozytoseleistung wurde bei der Auswertung zwischen starker und schwacher Phagozytose unterschieden. Zu den stark phagozytierenden Makrophagen wurden diejenigen Zellen gezählt, in denen mehr als 20 Bakterien bzw. 5 Erythrozyten nachweisbar waren. In schwach phagozytierenden Zellen waren dagegen bis zu 20 Bakterien bzw. bis zu 5 Erythrozyten nachweisbar. Die mit dieser Einteilung gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Beurteilung der Phagozytosefähigkeit der Knochenmarkskulturen nach 7 Tagen Inkubation. Die Werte sind in % der Gesamtmakrophagenzahl angegeben.

Phagozytosefähigkeit	Bakterien	EA++	E+
stark	93,0%	82%	1%
schwach	6,5%	14%	25%
fehlend	0,5%	4%	74%

E+ = Schafererythrozyten

EA++ = sensibilisierte Schafererythrozyten

3.3 Sekretorische Leistungen von mononukleären Phagozyten

Untersuchungen mit Stärkegel-induzierten peritonealen Makrophagen des Meerschweinchens haben ergeben, daß diese stimulierten Zellen lysosomale Enzyme und Komplementfaktoren sezernieren. In unseren Experimenten erhob sich die Frage, ob isolierte Makrophagen des Knochenmarks, welche aus unbehandelten Tieren gewonnen wurden, ähnliche sekretorische Leistungen vollbringen. Für die Analyse der Sekretionsleistung wurden Zellkulturen der am 7. Tag gewonnenen Makrophagen in einem Kulturmedium fortgesetzt, welchem natives Kälberserum (NBCS) oder erhitztes Kälberserum (NBCS 56°C) in Konzentrationen von 5% oder 20% zugesetzt worden war (vgl. Material und Methoden Abschn. 2.1.6). Die Fortsetzung der Kulturen in Medium ohne Serumzusatz erwies sich als ungünstig wegen der schlechten Überlebensrate der Makrophagen unter diesen Bedingungen. Zur Prüfung der Zellqualität der Makrophagen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen wurde die Menge der intrazellulären LDH herangezogen (siehe Material und Methoden Abschn. 2.5.1). Unter konstanten Versuchsbedingungen wurde mit zunehmender Kulturdauer bei allen Versuchen ein Abfall der intrazellulären LDH beobachtet (Tabelle 4). Dieser LDH-Abfall war weitgehend unabhängig von der Serumkonzentration des NBCS. Aus dieser Messung ist zu entnehmen, daß es kontinuierlich zu einem gewissen Zellverlust in den Kulturen kommt, welcher unbeeinflugt von den verschiedenen Serumzustzen abläuft.

Tabelle 4: Abfall der intrazellulären LDH bei einer Kulturdauer bis zu 72 Std.

Serumkonzentration im Kulturmedium	Menge der intra-zellulären LDH (U/ml) nach einer Kulturdauer von		
	24 Std.	48 Std.	72 Std.
5% NBGS	0,562+	0,355	0,275
5% NBGS 56°	0,579	0,231	0,252
20% NBGS	0,592	0,396	0,332
20% NBGS 56°	0,584	0,348	0,365

+ Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus den Messungen von 4 verschiedenen Kulturen.

3.3.1 β -D-Glucosaminidase

Messungen dieses lysosomalen Enzyms in den Makrophagen und in den Kulturüberständen über eine Periode von 72 Stunden ergaben einen kontinuierlichen Anstieg des extrazellulären Anteils an der Enzymaktivität (Tabelle 5). Die Gesamtmenge dieses Enzyms stieg über den Meßzeitraum in der Größenordnung von 10 bis 20% an. Aus den Messungen ist zu schließen, daß die β -D-Glucosaminidase unabhängig von unterschiedlichen Kulturbedingungen von den Makrophagen sezerniert wird. Eine geringe Neusynthese dieses Enzyms findet während des Beobachtungszeitraumes statt.

Tabelle 5: Sekretion der β -D-Glucosaminidase bei bis zu 72-stündiger Kulturdauer. Es erfolgt eine Ausschleusung dieses Enzyms in den Extrazellulärraum, wogegen nur eine geringe Neusynthese stattfindet.

Serumkonzentration im Kulturmedium	Menge an Gesamt- und extrazellulärer (EZ) N-acetyl- β -D-Glucosaminidase in mU/ml nach einer Kulturdauer von					
	24 Std.		48 Std.		72 Std.	
	gesamt	%EZ	gesamt	%EZ	gesamt	%EZ
5% NBCS	66,55+	30,8	73,71	44,1	79,83	58,6
5% NBCS 56°	69,63	30,8	62,10	50,9	73,30	59,1
20% NBCS	73,45	25,5	79,18	38,7	81	51,6
20% NBCS 56°	70,08	26,5	75,66	39,6	80	50,5

+ Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus den Messungen von 4 verschiedenen Kulturen.

3.3.2 Komplementprotein C3

Zusätzlich zu der β -D-Glucosaminidase-Aktivität wurde in allen Kulturüberständen auch die hämolytische C3-Aktivität bestimmt. Ein Anstieg des funktionell meßbaren C3 war sowohl im Kulturmedium mit 5% NBCS als auch im Medium mit 20% NBCS zu beobachten (Abb.10). Die höhere Serumkonzentration beeinflußt die C3-Sekretion nur in einem geringen Ausmaß. Ganz ähnliche Sekretionskinetiken von C3 wurden in zusätzlichen Experimenten gefunden, bei denen das native Kälberserum durch erhitztes Kälberserum (NBCS 56°C 30') in den gleichen Konzentrationen ersetzt wurde. Die höheren Meßwerte für C3 in Gegenwart von NBCS 56°C sind nicht Ausdruck verstärkter C3-Sekretion, sondern sie sind auf eine höhere Meßempfindlichkeit der C3 Tests in Gegenwart von NBCS 56°C zurückzuführen. (Vgl. Abschn.4.2.2).

Alle oben aufgeführten Ergebnisse mit Makrophagenkulturen erhielten wir mit Meerschweinchen, die nicht vorbehandelt worden waren. Parallel dazu wurde auch eine Versuchsreihe mit Stärkegel-induzierten Tieren durchgeführt, um zu sehen, ob durch die peritoneale Stimulation eine Änderung im Verhalten der Knochenmarksmakrophagen, insbesondere ihrer Sekretionsleistungen, eintritt. Dies war jedoch in keinem der untersuchten Parameter der Fall.

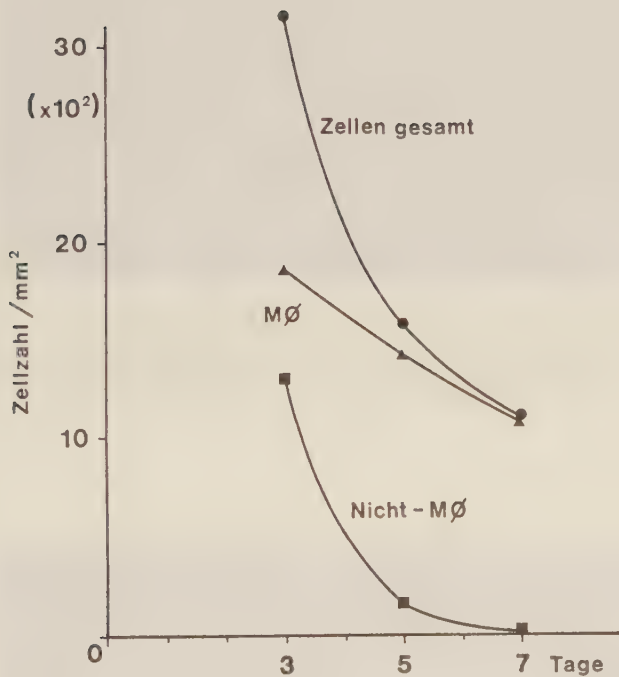


Abb. 1: Die durchschnittliche Zahl der adhärenenten Zellen am Deckglas während der Inkubationszeit. Am 7. Tag machen die Granulozyten nur etwa 1,5% der Gesamtzellzahl aus. Die Menge an Makrophagen nimmt vom 3. bis zum 7. Tag linear um 42% ab.

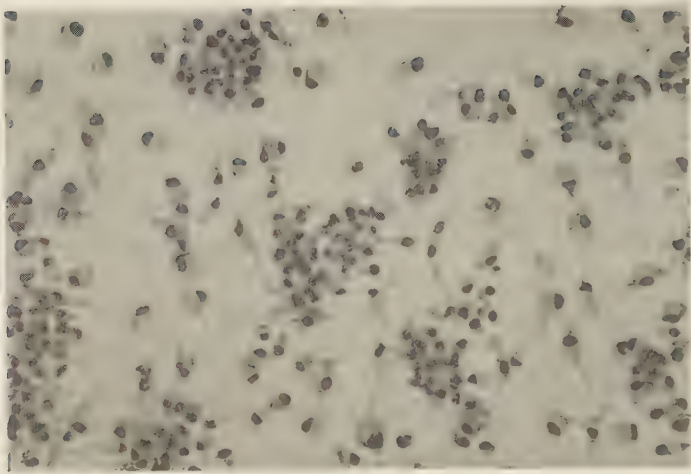


Abb. 4: Bei Weiterinkubation mit NBCS ist eine Häufchenbildung der Makrophagen nachweisbar. Diese Zellgruppen lösen sich im weiteren Verlauf der Kultur wieder auf. Giemsa, Vergr. 420 x

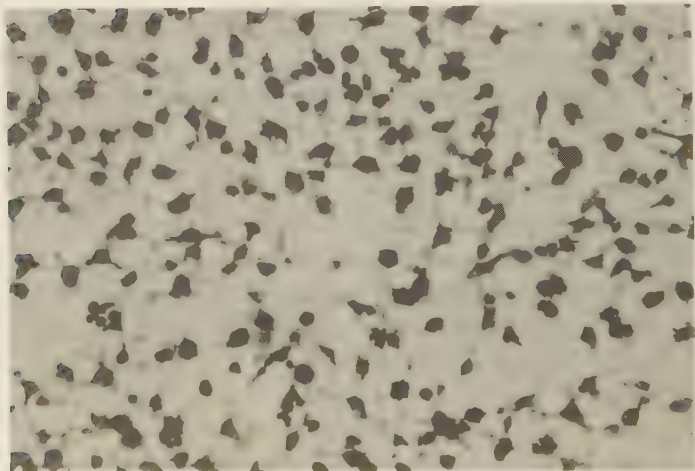


Abb. 5: Esterasenachweis. Das Zytoplasma Esterase-positiver Zellen erscheint braun. Der Kern ist häufig ausgespart. Ohne Gegenfärbung, Vergr. 340x

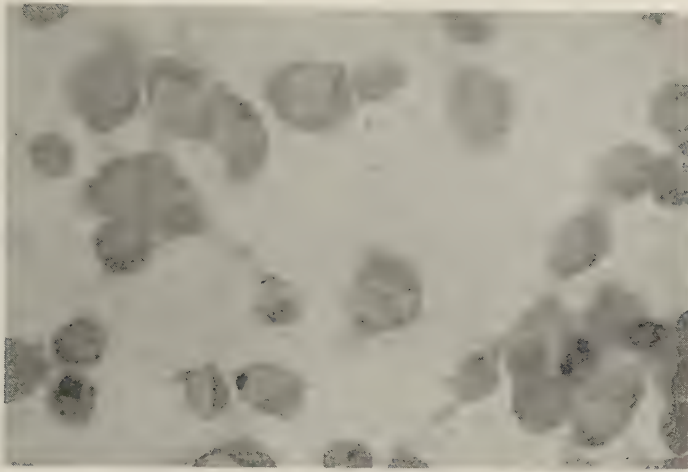


Abb. 6: Peroxidasenachweis. Peroxidasehaltige Granula im Zytoplasma einiger Makrophagen sind dunkelblau angefärbt, Ohne Gegenfärbung, Vergr. 1850x

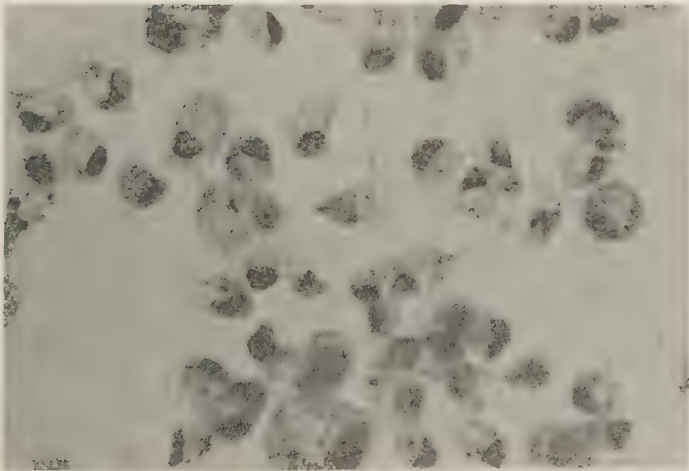


Abb. 7: Phagozytose von Bakterien. Die phagozytierten Staphylococcus aureus sind als dunkelblaue Punkte im Zytoplasma erkennbar. Giemsa, Vergr. 1480x

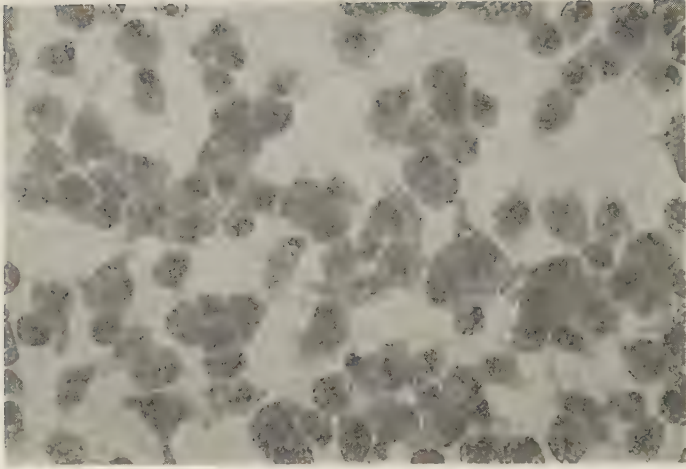


Abb. 8: Phagozytose von antikörperbeladenen Erythrozyten (EA-Zellen). Die Makrophagen sind mit Erythrozyten vollgefüllt. HE-Färbung, Vergr. 560x

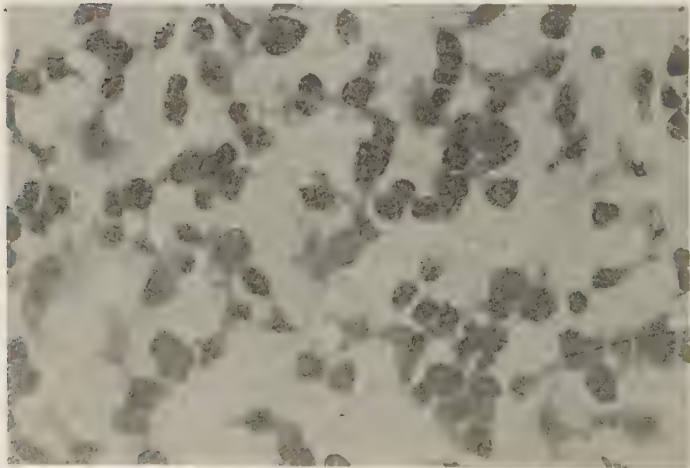


Abb. 9: Phagozytose von unbehandelten Erythrozyten (E-Zellen). Phagozytierte Erythrozyten sind nur vereinzelt nachweisbar. HE-Färbung, Vergr. 560x

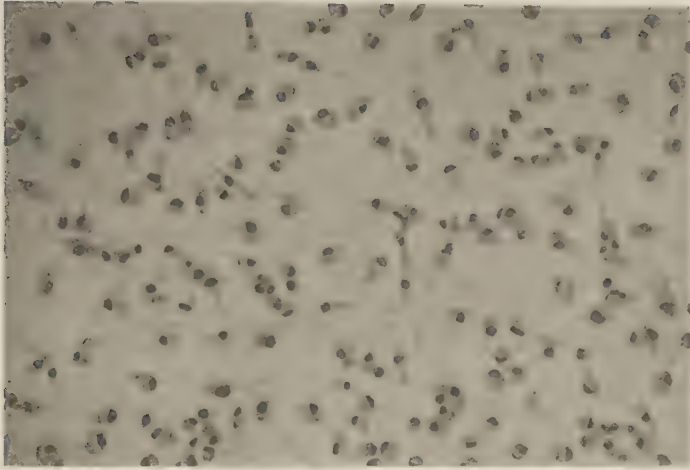


Abb. 2: Eine am 7. Tag gewaschene Kultur von Knochenmarkszellen
 besteht fast ausschließlich aus Makrophagen. Giemsa, Vergr. 430x

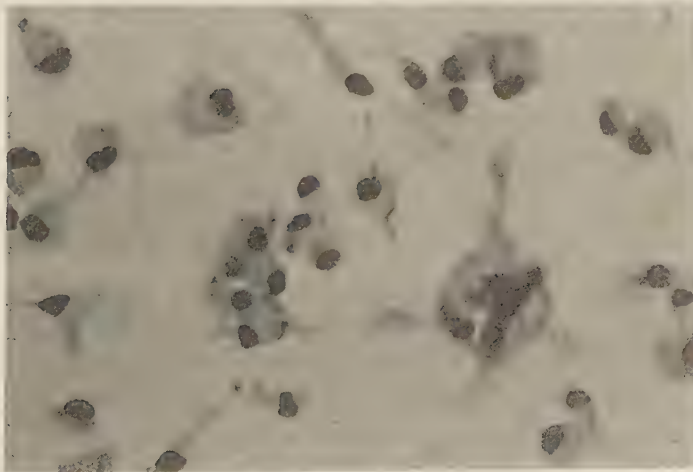


Abb. 3: Ein einzelnstehender mehrkerniger Makrophage aus einer
 7 Tage alten Kultur. Solche Zellen wurden vermehrt bei
 Weiterinkubation in frischem NBCS beobachtet. Giemsa, Verg. 1480x

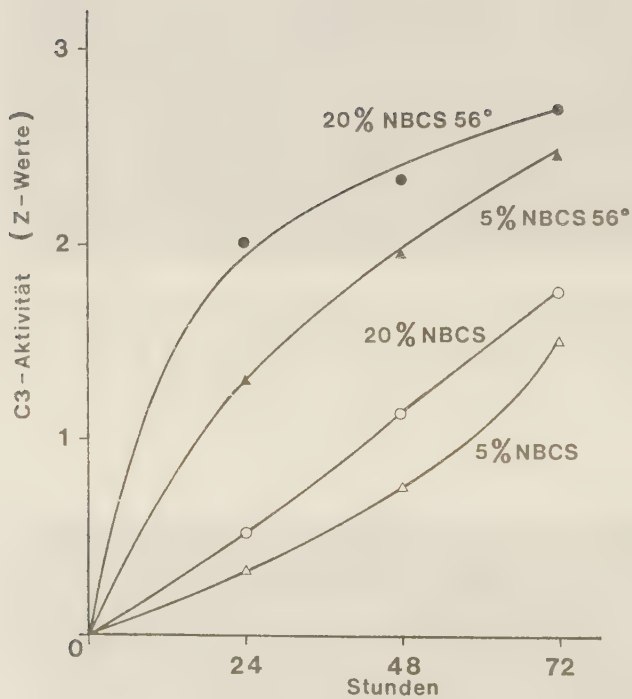


Abb. 10: Sekretion von C3 durch Makrophagen einer 7 Tage alten Knochenmarkskultur bei Weiterinkubation mit NBCS- bzw. NBCS 56°C-Zusatz zum Kulturmedium.

4. Diskussion

4.1 Bewertung des methodischen Vorgehens bei der Reinigung von Knochenmarksmakrophagen

4.1.1 Einfluß des Kälberserums (NBCS).

Bei Versuchen mit Makrophagen hat sich gezeigt, daß ein Serumzusatz zu dem Kulturmedium die Überlebensfähigkeit der Zellen in Kultur erheblich steigert. Im Falle der Knochenmarkskulturen konnten Makrophagen ohne Serumzusatz gar nicht zur Adhärenz gebracht werden. Wir prüften daher Kälberserum (NBCS) in verschiedenen Konzentrationen zwischen 5Vol% und 50Vol% als Mediumzusatz und beurteilten nach Inkubationsphasen bis zu 7 Tagen mikroskopisch die Zelldichte. Ab einer Konzentration von 30Vol% NBCS wurde ein dichter Rasen von adhärennten Zellen gewonnen. Für die 7-tägige Vorinkubation wurde daher in allen ausgewerteten Versuchen ein Serumzusatz von 30Vol% NBCS gewählt.

Nach dem Waschen am 7. Tag wurden die isolierten Makrophagen in Medium mit 5Vol% bzw. 20Vol% NBCS weiterinkubiert, weil die Zellen ohne Serumzusatz sehr schnell zugrunde gingen. Ein Teil der Versuche wurde mit hitzebehandeltem Kälberserum (NBCS 56°C) als Serumzusatz durchgeführt, um durch die Ausschaltung hitzelabiler Faktoren eine eventuelle Wirkung des im NBCS vorhandenen Komplements und anderer hitzelabiler Faktoren auf die Vitalität der Makrophagen und auf deren Sekretionsleistungen zu erfassen. Trotz Serumzusatzes kam es bei 3-tägiger Kultur der gereinigten Knochenmarksmakrophagen zu einem deutlichen Zellverlust, welcher durch Messung der intrazellulären LDH zu verschiedenen Zeiten erfaßt wurde (Tabelle 4). Damit zeigte sich, daß isolierte Knochenmarksmakrophagen des Meerschweinchens eine ähnlich hohe Empfindlichkeit wie die peritonealen Makrophagen von der gleichen Spezies bei der kulturellen Anzüchtung haben (15). Vergleiche der Serumzusätze im Hinblick auf unterschiedliche Konzentration und Hitzevorbehandlung ergab keine eindeutigen Unterschiede. Die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse lassen allenfalls den Schluß zu,

daß 20Vol% Serumzusatz bei längerer Kulturdauer ein etwas besseres Überleben der Makrophagen ermöglicht als ein 5Vol% Serumzusatz. Diese relativ schlechten Ergebnisse der gereinigten Knochenmarksmakrophagen überraschen in Hinblick auf die Beobachtung, daß die adhären-ten Zellen nach der ersten 7-tägigen Inkubation in Medium mit 30Vol% NBCS sehr vital aussehen und in großer Zahl vorliegen. Es muß daraus gefolgert werden, daß das Knochenmark mit seinen verschiedenen humo-ralen und zellulären Komponenten zusätzliche Faktoren liefert, welche einen günstigen Einfluß auf die Zellvitalität haben. Dieser Frage muß in weiteren Versuchen nachgegangen werden.

Die Auswertung der Sekretionsleistungen von gereinigten Knochenmarksmakrophagen ergab, daß die Konzentration und Hitzebehandlung des zugesetzten Serums die Meßwerte der gesamten und der extra-zellulären β -D-Glucosaminidase kaum beeinflusst (Tabelle 5). Bei der C3-Messung wurden mit 20Vol% nativem Serum deutlich höhere Werte gefunden als bei 5Vol% Serumzusatz (Abb. 10). Noch höhere C3-Werte ergaben sich bei Zusatz von NBCS 56°C in den getesteten Konzentrationen (Abb. 10). Diese Befunde erklären sich nach vorläufigen, nicht näher beschriebenen Untersuchungen nicht durch eine Sekretionssteigerung von C3 in Gegenwart von NBCS 56°C. Sie sind vielmehr darauf zurückzuführen, daß Serumpräparationen einen ganz erheblichen Einfluß auf die Empfindlichkeit des C3-Tests nehmen können. In Gegenwart des erhitzten Serums wird C3 mit einer besonders gesteigerten Empfindlichkeit gemessen. Daraus folgt, daß Vergleiche von C3-Messungen in verschiedenen Kulturmedien sehr schwierig sind und sorgfältiger Kontrollen bedürfen.

4.1.2 Einfluß der Glasoberfläche

Auf Plastikoberflächen, welche z.B. zur Kulturherstellung von peritonealen Makrophagen eingesetzt werden, zeigten die Knochenmarkszellen eine sehr schlechte Adhärenzfähigkeit. Wir mußten daher runde Deckplättchen aus Glas einführen, um die Adhärenzfähigkeit der Zellen zu verbessern. Außerdem konnten diese Deckgläschen mit dem darauf befindlichen Zellrasen den Kulturschalen entnommen, auf Objektträger geklebt und nach geeigneter Färbung mikroskopisch unter-

sucht werden. Da die Zelladhärenz in starkem Maße von der Sauberkeit der Glasoberfläche abhängig war, mußten die Deckgläschen einer sorgfältigen Reinigungsprozedur unterzogen werden (vgl. Abschnitt 2.1.4). Reste von Fett oder Detergens führten zum Verlust der Adhärenzfähigkeit.

4.1.3 Einfluß der Kulturdauer

Bei der Herstellung von Knochenmarkskulturen wurde das gesamte Knochenmark in Suspension gebracht. Während der ersten, 7 Tage langen Inkubationsphase befanden sich also Zellen sehr unterschiedlicher Herkunft in Kultur. Erst durch den Waschprozeß nach 7 Tagen wurden alle nicht adhärenenten Zellen entfernt. Das in Abb. 1 dargestellte Verhältnis adhärenter Granulozyten und Makrophagen bestimmte auch die Dauer der ersten Inkubation: Bis zum 7. Tag fiel der Granulozytenanteil auf nur noch ca. 1,5% bei guter Dichte des Makrophagenrasens. Am Ende der ersten Inkubationsphase lag die Zahl der adhärenenten Makrophagen bei etwa 5% der zu Kulturbeginn eingesetzten Gesamtzellzahl. Die Gesamtausbeute an Knochenmarksmakrophagen pro Tier betrug etwa $2,2 \times 10^7$ Zellen. Diese Zellen umfassen zum einen ausgereifte Knochenmarksmakrophagen, welche schon in der Knochenmarkspräparation von Anfang an vorlagen. Zusätzlich kam es während der 7-tägigen Inkubation zur Ausreifung von Vorläuferzellen zu differenzierten Makrophagen. Hierfür spricht die Beobachtung, daß der Prozentsatz Peroxidase-positiver Zellen während der Kulturperiode ständig abnahm. Ob in den gewonnenen Knochenmarkskulturen auch Zellteilungen von Makrophagen-Vorläuferzellen in nennenswertem Umfang stattfanden, läßt sich aus den durchgeführten Untersuchungen nicht ableiten. Eine ausreichend lange Kulturdauer des Knochenmarks ist somit nicht nur für Beseitigung kontaminierender Zellen notwendig, sondern sie gewährleistet auch eine hohe Zellausbeute durch die während dieser Zeit ablaufenden Entwicklungsprozesse bei den mononukleären Phagozyten. Eine weitere Verlängerung der Kulturperiode des Knochenmarks über 7 Tage hinaus brachte bei den hier gewählten Bedingungen keine zusätzlichen Vorteile.

4.2 Vergleich der isolierten Knochenmarksmakrophagen des Meerschweinchens mit Makrophagenkulturen anderer Herkunft

4.2.1 Charakterisierung der Makrophagen

Die aus dem Knochenmark hergestellten Kulturen bestanden nach 7-tägiger Inkubation ganz überwiegend aus Makrophagen. Die Zellen waren zu 99% Esterase-positiv (Abb. 5) und zu ca. 12% Peroxidase-positiv (Abb. 6). Etwa 99,5% von ihnen waren zur Phagozytose von Bakterien befähigt und 96% phagozytierten EA-Zellen (Abb. 7, 8, Tabelle 3). Der hohe Prozentsatz an Esterase-positiven und Peroxidase-negativen Zellen und die hohe Phagozytoserate weisen darauf hin, daß die Knochenmarksmakrophagen überwiegend ausgereift waren. Ein Vergleich mit Knochenmarkskulturen der Maus zeigt fast die gleichen Verhältnisse (60).

4.2.2 Sekretionsleistungen der Knochenmarksmakrophagen

Die gereinigten Makrophagen des Knochenmarks sezernierten sowohl die Komplementkomponente C3 (Abb. 10) als auch das lysosomale Enzym β -D-Glucosaminidase (Tabelle 5). Die C3-Sekretion wurde in unseren Versuchen zum ersten Mal bei Knochenmarksmakrophagen beobachtet. Es wurde nicht geprüft, ob die dritte Komplementkomponente während der Kulturperiode neu synthetisiert wird, wie es in anderen Versuchen für die peritonealen Makrophagen des Meerschweinchens nachgewiesen wurde (6). Besonderes Interesse verdient die Beobachtung, daß die isolierten Knochenmarksmakrophagen ohne in vivo Stimulation oder in vitro Aktivierung zu Sekretionsleistungen befähigt sind. Dies gilt sowohl für C3 als auch für das lysosomale Enzym β -D-Glucosaminidase. Für vergleichende Untersuchungen über die Sekretion von aktivem C3 liegen nur Berichte über die sekretorische Leistung von peritonealen Makrophagen des Meerschweinchens vor. Auch diese Zellen, welche allerdings nach in vivo Stimulierung aus der Bauchhöhle gewonnen wurden, sezernieren funktionell aktives C3 (6). Die sekretorische Leistung beider Zellpopulationen läßt sich jedoch quantitativ nicht vergleichen, da in unterschiedlichen Medien gearbeitet wur-

de. Ferner wurde kein Versuch unternommen, die gefundenen Aktivitäten durch Bezug auf einen Standard zu korrigieren und damit vergleichbar zu machen.

Eine weitergehende Aussage ermöglichen unsere Befunde über die Sekretion des lysosomalen Enzyms. Hier wurde ein Unterschied gegenüber peritonealen Exsudatmakrophagen des Meerschweinchens (15) in drei Punkten beobachtet: 1. der intrazelluläre Gehalt an β -D-Glucosaminidase lag bei Knochenmarksmakrophagen höher als bei peritonealen Makrophagen. 2. Die Sekretion dieses Enzyms verlief bei Knochenmarksmakrophagen langsamer. 3. Auch die Neusynthese der β -D-Glucosaminidase war bei Knochenmarksmakrophagen geringer als bei peritonealen Makrophagen. Diese vorläufigen Ergebnisse lassen noch die Frage offen, ob die Knochenmarksmakrophagen weniger stimuliert sind als Peritonealmakrophagen anderer Untersucher (15). Die Produktion und Sekretion der β -D-Glucosaminidase deutet dies zumindest an. Um genauere Ergebnisse zu erhalten, sind noch andere Sekretionsanalysen notwendig. Die Kultur der aus dem Knochenmark abstammenden reifen Makrophagen ist jedoch als Reinkultur für weitere Sekretionsversuche gut geeignet. Insbesondere dürfte die Frage von großem Interesse sein, ob Knochenmarksmakrophagen durch gezielte Stimulierung zur erhöhten funktionellen Leistung gebracht werden können, wie dies für residente Makrophagen der Maus schon in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden konnte (72).

5. Zusammenfassung

Zur Herstellung von Kulturen aus Knochenmarksmakrophagen wurde das gesamte Knochenmark aus dem Femur von Meerschweinchen entnommen. Die Knochenmarkszellen wurden in Medium mit Serumzusatz 7 Tage lang inkubiert. Während dieser Periode bildete sich auf dem Boden der Kulturschalen ein dichter Rasen adhärenter Zellen, welcher zu 98,5% aus Makrophagen bestand. Die Charakterisierung der isolierten Makrophagen wurde mit cytochemischen Nachweismethoden und funktionellen Tests durchgeführt. Dabei wurde gefunden, daß die Makrophagen zu einem hohen Prozentsatz (99,5%) Esterase-positiv und zu einem niedrigen Prozentsatz (12%) Peroxidase-positiv waren. Die Phagozytose von Bakterien und sensibilisierten Schafserythrozyten war bei fast allen Zellen stark ausgeprägt. Mit der entwickelten Methode wurde pro Tier eine Ausbeute von ca. $2,2 \times 10^7$ Zellen erzielt.

Nach der Herstellung der Kulturen von Knochenmarksmakrophagen wurden diese Zellen für einen weiteren Zeitraum von drei Tagen in serumhaltigem Medium inkubiert. Durch Messung der intrazellulären Laktatdehydrogenase-Aktivität ließ sich nachweisen, daß ein hoher Prozentsatz der Makrophagen während dieser Kulturperiode lebensfähig blieb. Zusätzlich wurde beobachtet, daß die isolierten Zellen das lysosomale Enzym β -D-Glucosaminidase und die Komplementkomponente C3 synthetisieren und sezernieren.

In den vorliegenden Untersuchungen ist erstmalig die Isolierung und Charakterisierung von Knochenmarksmakrophagen des Meerschweinchens beschrieben. Da diese Zellen von unbehandelten Tieren gewonnen wurden, liegen die mit der beschriebenen Methode isolierten Makrophagen in einem unstimulierten Zustand vor. Derartige Zellkulturpräparationen können besonders geeignet sein für weiterführende Untersuchungen, in denen die Aktivierung von Makrophagen durch gezielte Stimulierung geprüft wird. Hierbei ist von besonderem Interesse, inwieweit die Sekretion von lysosomalen Enzymen und von Komplementfaktoren, welche bei der Entzündungsreaktion und der antimikrobiellen Abwehr eine Rolle spielen, modulierbar ist durch eine Veränderung des Aktivitätszustandes der Makrophagen.

6. Literaturverzeichnis

1. Allison, A.C., Davies, P.: Mononuclear phagocyte activation in some pathological processes. In: Activation of Macrophages, Wagner, W.H., Hahn, H., Evans, R. (Eds.), p. 141. New York-Amsterdam: America Elsevier Publishing Co. Inc. 1975
2. Ansley, H., Ornstein, L.: Enzyme histochemistry and differential white cell counts on the Technicon Hemalog D. Advance. Automated Anal. 1, p. 5 (1970)
3. Arend, W.P., Mannik, M.: Quantitative studies on IgG receptors on monocytes. In: Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology, Van Furth, R. (Ed.), p. 303. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne: Blackwell Scientific Publications 1975
4. Basten, A., Mitchell, J.: Role of macrophages in T-cell-, B-cell collaboration in antibody production. In: Immunobiology of the Macrophage, Nelson, D.S. (Ed.), p. 45. New York-San Francisco-London: Academic Press 1976
5. Beelen, R.H.J., Broekhuis-Fluitsma, D.M., Korn, C., Hoefsmit, E.Ch.M.: Identification of exudate-resident macrophages on the basis of peroxidatic activity. J. Reticuloendothel. Soc. 23, p. 103 (1978)
6. Bentley, C., Fries, C. and Brade, V.: Synthesis of factors D, B and P of the alternative pathway of complement activation, as well as of C3, by guinea pig peritoneal macrophages in vitro. Immunology 35, p. 971 (1978)
7. Bergmeyer, H.U. und Bernt, E.: Lactat-Dehydrogenase. UV-Test mit Pyruvat und NADH. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. I, Bergmeyer, H.U. (Hsg.), Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., p.533 (1970)

8. Bitter-Suermann, D. et al.: Independent and consecutive action of the complement components C5, C6, C7 in immune hemolysis. *Immunochemistry* 7, p. 955 (1970)
9. Blanden, R.V., Hapel, A.J., Doherty, P.C., Zinkernagel, R.M.: Lymphocyte-macrophage interactions and macrophage activation in the expression of antimicrobial immunity in vivo. In: *Immunobiology of the Macrophage*, Nelson, D.S. (Ed.), p. 367. New York-San Francisco-London: Academic Press 1976
10. Blusse van Oud Alblas, A., Van Furth, R.: Origin, kinetics and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.* 149, p. 1504 (1975)
11. Borooah, J., Leaback, D.H. and Walker, P.G.: Studies on glucosaminidase. 2. Substrates for N-acetyl- β -glucosaminidase. *Biochem. J.* 78, p. 106 (1961)
12. Brade, V.: Die Sekretion von Mediatoren der Entzündung und der antimikrobiellen Abwehr durch Makrophagen. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 247, p. 259 (1980)
13. Brade, V.: The properdin system: Composition and Function. *Vox sang.* 35, p. 1 (1978)
14. Brade, V. and Bentley, C.: Synthesis and release of complement components by macrophages. In: *Mononuclear phagocytes. Functional aspects*. Van Furth, R. (Ed.), p. 1385. Martinus Nijhoff Publishers 1980
15. Brade, V., Damerau, B., Kreuzpaintner, G.: Studies on the influence of C3 fragments on the secretory function and viability of guinea pig peritoneal macrophages. In: *Heterogeneity of mononuclear phagocytes*, Förster, O., Landy, M. (Eds.). Academic Press 1981 p. 270

16. Brade, V., Kreuzpaintner, G.: Functional active complement secreted by guinea pig peritoneal macrophages. *Immunobiol.* 161, p. 315 (1982)
17. Bradley, T.R., Metcalf, D.: The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 44, p. 287 (1966)
18. Braunsteiner, H., Schmalzl, F.: Cytochemistry of monocytes and macrophages. In: *Mononuclear Phagocytes*, Van Furth, R. (Ed.), p. 62. Oxford-Edinburgh, Blackwell Scientific Publications 1970
19. Cardella, C.J., Davies, P. and Allison, A.C.: Immune complexes induce selective release of lysosomal enzymes from macrophages. *Nature (London)* 247, p. 46 (1974)
20. Carr, I.: *The macrophage: A review of ultrastructure and function*. London-New York: Academic Press 1973
21. Chervenick, P.A., Lobuglio, A.F.: Human blood monocytes: Stimulators of granulocytes and mononuclear colony formation in vitro. *Science* 178, p. 164 (1973)
22. Cohn, Z.A.: The structure and function of monocytes and macrophages. In: *Advances in Immunology*, Dicon, F.J., Kunkel, H.G. (Eds.), p. 164, New York-London: Academic Press 1968
23. Cohn, Z.A. and Benson, B.: The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry and biochemistry. *J. Exp. Med.* 121, p. 153 (1965)
24. Crofton, R.W., Diesselhoff-den Dulk, M.M.C. and Van Furth, R.: The origin, kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J. Exp. Med.* 147, p. 1 (1978)

25. Daems, W.Th., Koerten, H.K., Soranzo, M.R.: Differences between monocyte-derived and tissue macrophages. In: The reticulo-endothelial system in health and disease. Functions and characteristics, Reichard, S.M., Escobar, M.R., Friedman, H. (Eds.), p. 27. New York-London, Plenum Press 1976
26. David, J.R., Remold, H.G.: Macrophage activation by lymphocyte mediators and studies on the interaction of macrophage inhibitory factor (MIF) with its target cell. In: Immunobiology of the Macrophage, Nelson, D.S. (Ed.), p. 401. New York-San Francisco-London, Academic Press 1976
27. Davies, P., Allison, A.C.: Secretion of macrophage enzymes in relation to the pathogenesis of chronic inflammation. In: Immunobiology of the Macrophage, Nelson, D.S. (Ed.), p. 427. New York-San Francisco-London, Academic Press 1976a
28. Davis, P., Allison, A.C.: The macrophage as a secretory cell in chronic inflammation. Agents Actions 6, p. 60 (1976b)
29. Davies, P., Bonney, R.J., Dahlgren, M.E., Pelus, L., Kuehl, F.A., Humes, J.L.: Recent studies on the secretory activity of mononuclear phagocytes with special reference to prostaglandins. In: Perspectives in inflammation. Future trends and developments, Willoughby, D.A., Girond, J.P., Velo, G.P. (Eds.), p. 179. Lancaster MTP Press Ltd. 1977
30. Douglas, S.: Human monocyte spreading in vitro - inducers and effects on Fc and C3 receptors. Cell. Immunol. 21, p. 344 (1976)
31. Dumonde, D.C., et al.: Lymphokines and macrophage function in the immunological response. In: Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology, Van Furth, R. (Ed.), p. 675. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975

32. Ebert, R.H., Florey, H.W.: The extravascular development of the monocyte observed in vivo. *Brit. J. Exp. Path.* 20, p. 342 (1939)
33. Ehlenberger, A.C. and Nussenzweig, V.: The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J. Exp. Med.* 145, p. 357 (1977)
34. Engh, G. van den,: Early events in haemopoietic cell differentiation. Dissertation Delft 1976
35. Epstein, L.B.: The ability of macrophages to augment in vitro mitogen and antigen-stimulated production of interferon and other mediators of cellular immunity by lymphocytes. In: *Immunobiology of the Macrophage*, Nelson, D.S. (Ed.), p. 201. New York-San Francisco-London, Academic Press 1976
36. Epstein, L.B.: Interferons and their actions. Stewart, W.E. (Ed.), p. 91. CRC Press, Cleveland/Ohio (1977)
37. Evans, R.: Macrophage cytotoxicity. In: *Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology*, Van Furt, R. (Ed.), p. 827. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975
38. Evans, R., Alexander, P.: Mechanisms of extracellular killing of nucleated mammalian cells by macrophages. In: *Immunobiology of the macrophage*, Nelson, D.S. (Ed.), p. 535, New York-San Francisco-London, Academic Press 1976
39. Feldman, M., Schrader, J.W., Boylston, A.: Macrophage lymphocyte interaction in vitro. In: *Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology*, Van Furth, R. (Ed.), p. 779. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975

40. Van Furth, R.: Inflammation. Vane, J.R., Ferreira, S.H. (Eds.), p. 68. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1978
41. Van Furth, R.: Modulation of monocyte production. In: Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology, Van Furth, R. (Ed.), p. 161. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975
42. Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphry, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L.: The mononuclear phagocyte system: A new classification of macrophages, monocytes and their precursors. Bull. Wld. Hlth. Org. 46, p. 845 (1972)
43. Van Furth, R. and Cohn, Z.A.: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 128, p. 415 (1968)
44. Van Furth, R., Diesselhoff-den Dulk, M.M.C.: The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. J. Exp. Med. 132, p. 813 (1970)
45. Van Furth, R., Diesselhoff-den Dulk, M.M.C., Mattie, H.: Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. J. Exp. Med. 138, p. 1314 (1973)
46. Van Furth, R. and Diesselhoff-den Dulk, M.M.C.: Method to prove ingestion of particles by macrophages with light-microscopy. Scan. J. of Immunol. 12, p. 265 (1980)
47. Van Furth, R., Fedorko, M.E. and Hirsch J.G.: Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes and macrophages. J. Exp. Med. 132, p. 794 (1970)

48. Gallily, R.: The killing capacity of immune macrophages. In: Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology, Van Furth, R. (Ed.), p. 894. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell-Scientific Publications 1975
49. Golde, D.W., Finley, T.N., Cline, M.J.: Production of colony-stimulating factor by human macrophages. *Lancet* II, p. 1397 (1972)
50. Griffin, F.M., Jr., Griffin J.A., Leider, J.E. and Silverstein, S.C.: Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J. Exp. Med.* 142, p. 1263 (1975)
51. Griffin, F.M., Jr., Griffin, J.A. and Silverstein, S.C.: Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 144, p. 788 (1976)
52. Kaplow, S.L.: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blood* 26, p. 215 (1965)
53. Karnovsky, M.L., Lasdins, J., Simmons, S.R.: Metabolism of activated mononuclear phagocytes at rest and during phagocytosis. In: Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology, Van Furth, R. (Ed.), p. 423. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publication 1975
54. Keller, R.: Cytostatic and cytocidal effects of activated macrophages. In: Immunobiology of the macrophage, Nelson, D.S. (Ed.), p. 487. New York-San Francisco-London, Academic Press 1976

55. Klebanoff, S.J., Hamon, B.: Antimicrobial systems of mononuclear phagocytes. In: Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology, Van Furth, R. (Ed.), p. 507. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975
56. Lay, W.H. and Nussenzweig, V.: Receptors for complement on leukocytes. J. Exp. Med. 128, p. 991 (1968)
57. Littleton, Ch., Kessler, D., Burkholder, P.M.: Cellular basis for synthesis of the fourth component of Guinea-pig complement as determined by a haemolytic plaque technique. Immunology, 18, p. 693 (1970)
58. Lohmann-Matthes, M.L., Fischer, H.: Macrophage-mediated cytotoxic induction by a specific T-cells factor. In: Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology, Van Furth, R. (Ed.), p. 845. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975
59. Mackaness, G.B.: The phagocytosis and inactivation of staphylococci by macrophages of normal rabbits. J. Exp. Med. 112, p. 35 (1960)
60. Van der Meer, ., et al.: Long term cultures of murine bone marrow mononuclear phagocytes. In: Mononuclear Phagocytes. Functional aspects. Van Furth, R. (Ed.), p. 343. Martinus Nijhoff Publishers 1980
61. Metcalf, D.: Regulation of granulocyte and monocyte-macrophage proliferation by colony stimulating factor (CSF): A review. Exp. Hemat. 1, p. 185 (1973)
62. Meuret, G., Hoffmann, G.: Monocyte kinetic studies in normal and disease states. Brit. J. Haemat. 24, p. 275 (1973)

63. Müller, W., Hanauske-Abel, H. and Loos, M.: Biosynthesis of the first component of complement by human and guinea pig peritoneal macrophages. Evidence for an independent production of the C1 subunits. *J. Immunol.* 121, p. 1578 (1978)
64. Neumann, C. and Sorg, C.: Immune interferon. I. Production by lymphokine-activated murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 7, p. 719 (1977)
65. Nichols, B.A., Bainton, D.F.: Ultrastructure and cytochemistry of mononuclear phagocytes. In: *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology*, Van Furth, R. (Ed.), p. 17. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975
66. Oppenheim, J.J., Seeger, R.C.: The role of macrophages in the induction of cell mediated immunity in vivo. In: *Immunobiology of the Macrophage*, Nelson, D.S. (Ed.), p. 111. New York-San Francisco-London, Academic Press 1976
67. Ornstein, L., Anslay, H. and Saunders, S.: Improving manual differential white cell counts with cytochemistry. *Blood Cells* 2, p. 557 (1976)
68. Pelus, L.M. and Strausser, H.R.: Prostaglandins and the immune response. *Life Sci.* 20, p. 903 (1977)
69. Remington, J.S., Krahenbuhl, J.L., Hibbs, J.B.: A role for the macrophage in resistance to tumor development and tumor destruction. In: *Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology*, Van Furth, R. (Ed.), p. 869. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975
70. Ruscetti, F.W., Chervenick, P.A.: Release of colony stimulating factor from monocytes by endotoxin and polynosinic-polycytidylic acid. *J. Lab. clin. Med.* 83, p. 64 (1974)
71. Ryan, G.B., Spector, W.G.: Macrophage turnover in inflamed connective tissues. *Proc. roy. Soc. B* 175, p. 269 (1970)

72. Schorlemmer, H.-U., Dyvies, P. and Allison, A.C.: Ability of activated complement components to induce lysosomal enzyme release from macrophage. *Nature (London)* 262, p. 48 (1976)
73. Stanley, E.R., Hansen, G., Woodcock, J., Metcalf, D.: Colony stimulating factor and the regulation of granulopoiesis and macrophage production. *Fed. Proc.* 34, p. 2272 (1975)
74. Stecher, V.J.: Synthesis of proteins by mononuclear phagocytes. In: *Mononuclear Phagocytes*, Van Furth, R. (Ed.), p. 133. Oxford-Edinburgh, Blackwell Scientific Publications 1970
75. Tevethia, S.S., Zarling, J.M, Flax, M.H.: Macrophages and the destruction of syngeneic virus induced tumors. In: *Immunobiology of the Macrophage*, Nelson, D.S. (Ed.), p. 509. New York-San Francisco-London, Academic Press 1976
76. Unanue, E.R.: The regulation of the immune response by macrophages. In: *Mononuclear Phagocytes in immunity, infection and pathology*, Van Furth, R. (Ed.), p.721. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Blackwell Scientific Publications 1975
77. Vassalli, J.-D. and Reich, E.: Macrophages plasminogen activator: Induction by products of activated lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 145, p. 429 (1977)
78. Vogt, W., Activation, activities and pharmacologically active products of complement. *Pharmacological Reviews* 26, No.2, USA (1974)
79. Van Waarde, D., Hulsing-Hesselink, E., Van Furth, R.: Properties of a factor increasing monocytopoiesis (FIM) occurring in the serum during the early phase of an inflammatory reaction. *Blood* 50, p. 727 (1977)

80. Wahl, L.M., Wahl, S.M., Mergenhagen, S.E. and Martin, G.R.: Collagenase production by endotoxin-activated macrophages. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, p. 3598, USA (1974)
81. Werb, U. and Gordon, S.: Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. J. Exp. Med. 142, p. 346 (1975)
82. Whaley, K.: Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. J. Exp. Med. 151, p. 501 (1980)
83. White, R., Lin, H.-S. and Kuhn, C.: Elastase secretion by peritoneal exudative and alveolar macrophages. J. Exp. Med. 146, p. 802 (1977)
84. Wyatt, H.V., Colten, H.R., Borsos, T.: Production of the second and fourth components of guinea pig complement by single peritoneal cells: Evidence that one cell may produce both components. J. Immunol. 108, No. 6, USA (1972)

Alle meine Versuche wurden im Labor von
Herrn Prof. V. Brade durchgeführt.

Mein besonderer Dank für die tatkräftige
Unterstützung bei meinem Vorhaben gilt
ihm und allen Mitarbeitern seines Labors,
sowie Herrn Dr. G. Arnold vom Institut
für Anatomie.

Lebenslauf

- 30.03.56 geboren in Teplice/ČSSR als Sohn von Josef Jelínek und Jiřina Jelínková, geb. Filová
- 1962-64 Volksschule Teplice
- 1964-68 Volksschule Ústíⁿ/L
- 1968 Emigration mit den Eltern in die BRD,
Anerkennung als Asylberechtigter
- 1969 Eintritt in das Christian-Ernst-Gymnasium
(Musisches Gymnasium) Erlangen
- 1975 Abitur
- 1975-81 Studium der Medizin an der Universität
Erlangen-Nürnberg
- 1981-82 Praktisches Jahr am Medical College Galway/Eire
und Stadt Krankenhaus Hof
- April 82 Staatsexamen
- seit Juli 82 als Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung
des Kreiskrankenhauses Hersbruck (Chefarzt
Dr. Eisler) tätig

